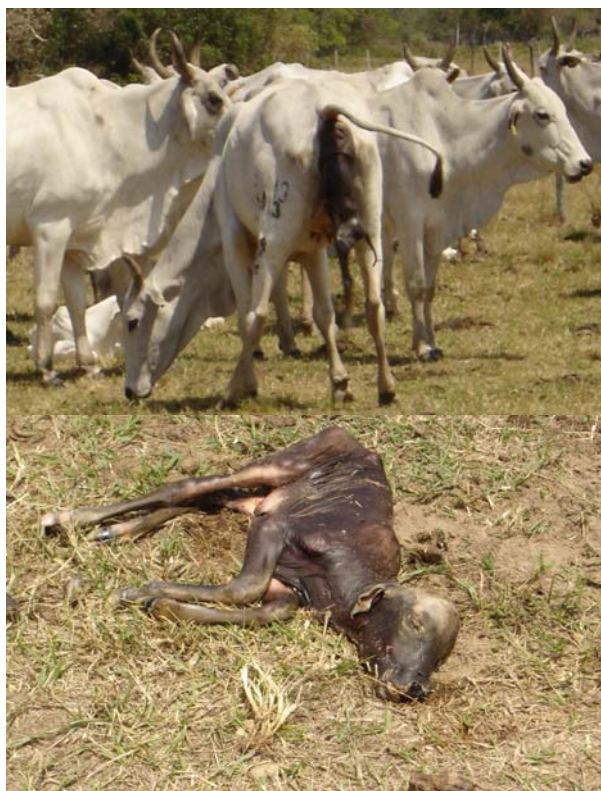


Corumbá, MS
Dezembro, 2009**Autores****Renata Graça Pinto Tomich**ICB/UFGM – Microbiologia, CP 486,
31270-901, Belo Horizonte, MG**Raquel Soares Juliano**Embrapa Pantanal, CP 109,
79320-900, Corumbá, MS**Aiesca Oliveira Pellegrin**Embrapa Pantanal, CP 109,
79320-900, Corumbá, MS**Maria Rosa Quaresma Bomfim**ICB/UFGM – Microbiologia, CP 486,
31270-901 Belo Horizonte, MG**Edel Figueiredo Barbosa-Stancioli**ICB/UFGM – Microbiologia, CP 486,
31270-901 Belo Horizonte, MG**Matilde Cota Koury**ICB/UFGM – Microbiologia, CP 486,
31270-901 Belo Horizonte, MG

Ensaio Imunoenzimático (ELISA) com Antígeno Recombinante Para Triagem de Bovinos Positivos Para Leptospirose



A leptospirose é uma zoonose mundialmente distribuída que afeta animais silvestres, domésticos e o homem. Em bovinos, a doença causa problemas reprodutivos, tais como, abortos espontâneos, fetos mumificados, nascimentos de bezerros fracos, aumento de intervalo entre partos e repetições irregulares do cio. As fontes de infecção são animais portadores que contaminam o pasto, a água e os alimentos com urina. Além de fetos abortados e corrimentos uterinos contendo a bactéria. A persistência do microorganismo em uma região esta relacionada à alta umidade e alcalinidade

do solo, temperaturas elevadas e existência de reservatórios silvestres ou domésticos. Por isso, a ocorrência de surtos, a diversidade de sorovares presentes na população e outros aspectos epidemiológicos dessa enfermidade têm características regionais (ELLIS, 1994; RADOSTITS et al., 2002).

A *Leptospira interrogans*, agente etiológico dessa enfermidade, está agrupada em 23 sorogrupos, antigenicamente distintos, aos quais pertencem diversos sorovares (FAINE, 1982), alguns deles exemplificados na Tabela 1.

Nos bovinos, alguns surtos estão associados à infecção pelos sorovares *pomona*, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae* e *autumnalis*. O sorovar *hardjo*, que está mais adaptado a essa espécie, pode provocar transtornos reprodutivos, mas geralmente leva a quadros subclínicos (SULLIVAN, 1974).

No Brasil, inquéritos sorológicos revelaram que o sorovar *hardjo* está distribuído por todo rebanho bovino, além da presença de *wolffi*, *pomona*, *hebdomadis*, *pyrogenes* e *grippotyphosa* ser bastante frequente (FÁVERO et al., 2001). Na planície pantaneira, sub-região da Nhecolândia, foram encontradas reações sorológicas para *hardjo*, *wolffi*, *grippotyphosa*, *pomona* entre outros em bovinos e bubalinos, com ressalvas a importância da fauna silvestre e outras espécies domésticas como reservatório de *icterohaemorrhagiae* e *copenhageni* (PELLEGRIN et al., 1992; PELLEGRIN; SERENO, 1994; GIRIO et al., 1998; 2004; TOMICH et al., 2007).

Tabela 1. Sorogrupos e sorovares de *L. interrogans*.

Sorogrupo	Sorovares
Icterohaemorrhagiae	<i>ilcterohaemorrhagiae</i> , <i>copenhageni</i>
Hebdomadis	<i>hebdomadis</i> , <i>jules</i> , <i>kremastos</i>
Pyrogenes	<i>pyrogenes</i>
Grippotyphosa	<i>grippotyphosa</i> , <i>canalzonae</i> , <i>ratnapura</i>
Canicola	<i>canicola</i>
Autumnalis	<i>autumnalis</i> , <i>fortbragg</i> , <i>bim</i> , <i>weerasinghe</i>
Australis	<i>australis</i> , <i>bratislava</i> , <i>lora</i>
Pomona	<i>pomona</i>
Sejroe	<i>hardjo</i> , <i>wolffi</i> , <i>sejroe</i> , <i>saxkoebing</i>
Tarassovi	<i>tarassovi</i>
Ballum	<i>ballum</i> , <i>aroborea</i>

Fonte: Levett (2001)

Métodos de diagnóstico diretos

O diagnóstico da leptospirose pode ser feito através de métodos diretos, pela visualização ou isolamento bacteriológico do agente no sangue, em fluidos corporais ou tecidos infectados. Podem ser utilizados os métodos de microscopia de campo escuro, histologia com coloração especial, imunofluorescência direta, isolamento microbiológico em meios de cultura e detecção do DNA bacteriano por métodos moleculares (FAINE et al., 1999). Os

métodos diretos são bastante laboriosos e apresentam dificuldades relacionadas principalmente à sensibilidade dos testes, com exceção dos métodos moleculares que, apesar de muito sensíveis e específicos, são onerosos e exigem maior preparo técnico e infraestrutura laboratorial para executá-los.

Métodos de diagnóstico indiretos

Os métodos indiretos de diagnóstico baseiam-se na detecção de anticorpos específicos para *L. interrogans* no soro dos animais.

O teste de soroaglutinação microscópica (SAM) é o teste padrão recomendado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003) (Figura 1). É um método dispendioso, pois todos os animais são testados para cada sorovar, utilizando diferentes diluições de soro. Além disso, é potencialmente perigoso por utilizar leptospirosas vivas como antígenos sendo necessária a manutenção de sorovares de referência, representantes dos vários sorogrupos (ELLIS, 1994). Porém é possível identificar qual o sorovar circulante na população estudada, além de quantificar a intensidade da produção de anticorpos (titulação de anticorpos) e a soroconversão dos mesmos, se forem efetuadas coletas pareadas. Essas características são importantes no estudo da epidemiologia dessa enfermidade, pois indicam se há infecção aguda, qual o grau de imunidade da população, qual a provável fonte de infecção e a diversidade antigênica presente, contribuindo para a formulação de vacinas contendo os sorovares prevalentes em regiões específicas.

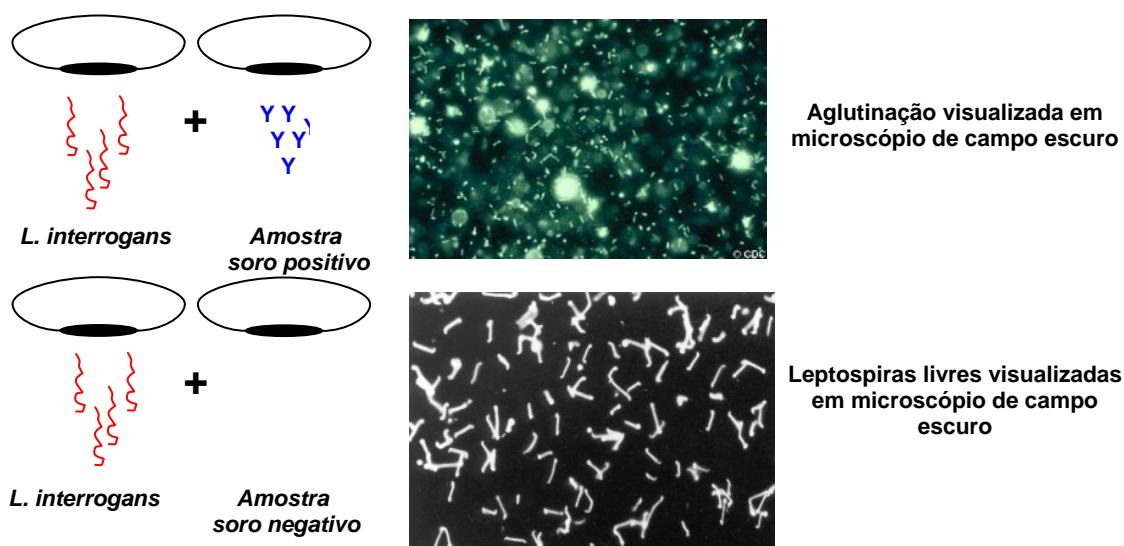


Figura 1. Representação esquemática do teste de SAM para detecção de anticorpos específicos de *L. interrogans*. Y = representação esquemática de anticorpo.

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISAs) têm sido desenvolvidos como métodos alternativos de triagem soropidemiológica para a leptospirose bovina. Podem-se destacar como vantagens do teste de ELISA em relação à SAM, a segurança (não utiliza bactérias vivas), a alta sensibilidade do teste, a facilidade de execução da análise, rapidez, menor custo e a objetividade da interpretação dos resultados (BOMFIM et al., 2005).

O ELISA baseia-se na formação de um complexo antígeno-anticorpo (Ag-Ac), com atividade imunológica e enzimática. Ao adicionar-se um substrato cromógeno ocorre o desenvolvimento de coloração, que pode ser mensurado com o auxílio de um espectrofotômetro (MADRUGA et al., 2001).

O teste de ELISA é composto por um antígeno solúvel de *Leptospira interrogans* que é adsorvido em placa de poliestireno de 96 poços. Na sequência, adiciona-se a amostra a ser testada e nos poços em que foram adicionados soros positivos (contendo IgG), os anticorpos específicos formam reações antígeno-anticorpo. Para detectar o complexo antígeno-anticorpo, um segundo anticorpo é adicionado, a anti-IgG bovina marcada com um cromógeno enzimático (fosfatase alcalina), posteriormente o substrato p-nitrofenil fosfato é colocado e a reação positiva é evidenciada pela produção de uma cor amarela (Figura 2).

Nos poços em que a reação antígeno-anticorpo não ocorreu devido à ausência de anticorpos específicos para *Leptospira* no soro

do animal (animal negativo), a enzima é removida nas sucessivas etapas de lavagem da placa de 96 poços, e, dessa forma, o substrato não é quebrado e não há formação de cor amarela.

As proteínas de membrana da *Leptospira* podem ser considerados antígenos altamente conservados e estáveis e por isso há interesse nessas proteínas para o desenvolvimento de testes de diagnóstico sorológico para a leptospirose (HAAKE; MATSUNAGA, 2005). A Lip L32 é uma das principais proteínas externas de membrana cuja expressão é restrita às espécies patogênicas (BISWAS et al., 2005). Além disso, a resposta imunológica do hospedeiro à LipL32 é bastante intensa. Essas características sugerem que a LipL32 seja adequada ao desenvolvimento de novos testes de diagnóstico sorológico para a leptospirose (HAAKE et al., 2000).

Ressalta-se que testes sorológicos usando proteínas recombinantes podem alcançar altas sensibilidade e especificidade devido à maior concentração de antígeno imunoreativo e à ausência de sítios inespecíficos. A lipoproteína recombinante LipL32 (r LipL32) tem sido utilizada em ELISAs para diagnóstico de leptospirose humana (FLANNERY et al., 2001), canina (DEY et al., 2004) e bovina (BOMFIM et al., 2005; TOMICH et al., 2007).

4 Ensaio imunoenzimático (ELISA) com antígeno recombinante para triagem de bovinos positivos para leptospirose

Tomich et al. (2007) utilizaram um ELISA com rLipL32 para a triagem de bovinos soropositivos para *L. interrogans*, detectando imunoglobulina G (IgG) e concluíram que o teste mostrou-se bastante sensível (99,3%), específico (86,3%) em comparação com a

SAM, além de apresentar uma acurácia de 94,7%. Do total de 282 amostras testadas, 143 (50,7%) foram positivas no teste de SAM e 161 (57,1%) no teste de IgG ELISA rLipL32 resultando em uma diferença significativa ($p < 0,001$).

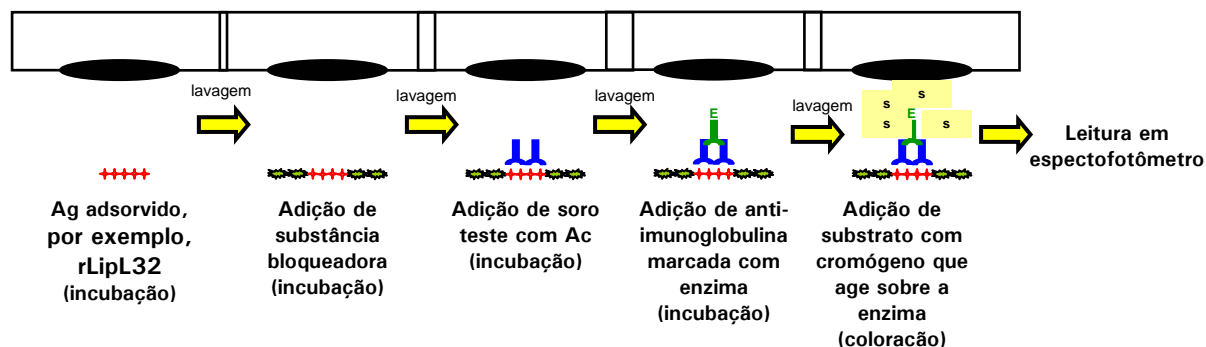


Figura 2. Representação esquemática do teste de ELISA indireto para detecção de anticorpos específicos contra *L. interrogans*. Ag = Antígeno; rLipL32 = lipoproteína de membrana da *Leptospira* recombinante; Ac = Anticorpo.

Recomendações

A alta sensibilidade e especificidade apresentada pelo IgG ELISA rLipL32 sugere que este teste pode ser aplicado em investigações soropidemiológicas de leptospirose bovina, para triagem de animais positivos, conferindo mais rapidez e praticidade aos procedimentos laboratoriais. Para que isso ocorra deve-se investir em pesquisas que viabilizem a produção de kits comerciais do IgG ELISA rLipL32.

Posteriormente à essa triagem inicial, apenas os animais soropositivos seriam testados por SAM para definir aspectos importantes da epidemiologia dessa enfermidade, tais como: sorovares prevalentes na população, intensidade da produção de anticorpos específicos e soro conversão para o diagnóstico de casos agudos, coletando-se amostras pareadas. Dessa forma, a triagem inicial além de aumentar a velocidade de análise, diminuiria a quantidade de amostras a serem testadas pelo laborioso teste de SAM.

Agradecimentos

A Ernande Ravagli pela foto da capa (vaca abortando).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão de bolsas e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

Referências

BISWAS, D.; ROY, S.; VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; NATARAJASEENIVASAN, K.; SEHGAL, S. C. Comparison of immunoreactive proteins of commonly circulating serogroups of *Leptospira* in Andaman Islands, India. **Indian Journal of Medical Research**, v.121, n.3, p.151-158, 2005.

BOMFIM, M. R. Q.; KO, A.; KOURY, M. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.109, n.1, p.89-94, 2005.

- DEY, S.; MOHAN, C. M.; KUMAR, T. M.; RAMADASS, P.; NAINAR, A. M.; NACHIMUTHU, K. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. **Veterinary Microbiology** v.103, n.1-2, p.99-106, 2004.
- ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.10, n.3, p.463-478, 1994.
- FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. Geneva: World Health Organization, 1982. 172p. (WHO offset publication; 67).
- FAINE, S.; ALDER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2ed. Melbourne: MediSci, 1999. 272p.
- FÁVERO, M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M. M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, F. Leptospirose bovina- variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, n.2, p.29-35, 2001.
- FLANNERY, B.; COSTA, D.; CARVALHO, F. P.; GUERREIRO, H.; MATSUNAGA, J.; DA SILVA, E. D.; FERREIRA, A. G.; RILEY, L. W.; REIS, M. G.; HAAKE, D. A.; KO, A. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.9, p.3303-3310, 2001.
- GIRIO, R. J. S.; HERRERA, R. C. P.; PEREIRA, F. J. G.; MATHIAS, L. A. Pesquisa de infecção por *Leptospira interrogans* em animais da região de Nhecolândia, no Pantanal do Mato Grosso do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.65, supl., p.87, 1998. Edição dos resumos da 11a. Reunião Anual do Instituto Biológico - RAIB. Resumo 126.
- GIRIO, R. J. S.; PEREIRA, F. L. G.; MARCHIORI FILHO, M.; MATHIAS, L. A.; HERREIRA, R. C. P.; ALES, A. C.; GIRIO, T. M. S. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira spp* em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil : utilização da técnica de imuno-histoquímica para detecção do agente. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 165 – 169, 2004.
- HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v.68, n.4, p.2276-2285, 2000.
- HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Leptospiral membrane proteins--variations on a theme? **Indian Journal of Medical Research**, v.121, n.3, p.143-5, 2005.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.2, p.296–326. 2001.
- MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 360p.
- PELLEGRIN, A.O.; GUIMARÃES, P.H. da S.; SERENO, J.R.B.; FIGUEIREDO, J. O. Levantamento sorológico de aglutininas anti-leptospira em bovinos da sub-região da Nhecolândia, Pantanal Sul- Matogrossense. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 22., 1992, Curitiba. **Resumos...** [S.l.: s.n.], 1992. p. 145.
- PELLEGRIN, A.O.; SERENO, J.R.B. Leptospirose e sua relação com fertilidade em grupos de matrizes neloradas no Pantanal, sub-região da Nhecolândia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., 1994, Olinda. **Resumos...** Olinda: Sociedade Pernambucana de Medicina Veterinária, 1994. p.189.
- RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G. J., HOUSTON, D. M. **Examen y diagnostico clinico en veterinaria**. Madrid: Ediciones Hancourt AS, 2002. 771p.
- SULLIVAN, N. D. Leptospirosis in animals and man. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, p.216-223, 1974.
- TOMICH, R. G. P.; BOMFIM, M. R. O.; KOURY, M. C.; PELLEGRIN, A. O.; PELLEGRIN, L. A.; KO, A. I.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. Leptospirosis serosurvey in bovines from brazilian Pantanal using IgG ELISA with recombinant protein LipL32 and

6 *Ensaio imunoenzimático (ELISA) com antígeno recombinante para triagem de bovinos positivos para leptospirose*

microscopic agglutination test. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 38, p.674-680, 2007.

WHO. World Health Organization. **Human leptospirosis**: guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta: WHO, 2003. 122p. Disponível em:
<http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CD_S_CSR_EPH_2002.23.pdf>. Acesso em: 14 abril 2010.

COMO CITAR ESTE DOCUMENTO

TOMICH, R. G. P.; JULIANO, R. S.; PELLEGRIN, A. O.; BOMFIM, M. R. Q.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; KOURY, M. C. **Ensaio imunoenzimático (ELISA) com antígeno recombinante para triagem de bovinos positivos para leptospirose**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2009. 6 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 86). Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/download.php?arq_pdf=CT86>. Acesso em: 31 dez 2009.

**Circular
Técnica, 86**

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Pantanal
Endereço: Rua 21 de Setembro, 1880
Caixa Postal 109
CEP 79320-900 Corumbá, MS
Fone: 67-32345800
Fax: 67-32345815
Email: sac@cpap.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2009): formato digital

**Comitê de
Publicações**

Presidente: *Thierry Ribeiro Tomich*
Secretário-Executivo: *Suzana Maria Salis*
Membros: *Debora Fernandes Calheiros*
Marçal Henrique Amici Jorge
Jorge Antônio Ferreira de Lara
Regina Célia Rachel

Expediente

Supervisor editorial: *Suzana Maria Salis*
Normatização bibliográfica: *Viviane de Oliveira Solano*
Tratamento das ilustrações: *Regina Célia Rachel*
Editoração eletrônica: *Regina Célia Rachel*
Disponibilização na home page: *Luiz E.M. Britto*